

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-247822  
(P2005-247822A)

(43) 公開日 平成17年9月15日(2005.9.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>CO7C 59/68</b>	CO7C 59/68	4B064
<b>CO7K 16/44</b>	CO7K 16/44	4B065
<b>C12N 5/10</b>	GO1N 33/53	S 4H006
<b>GO1N 33/53</b>	GO1N 33/577	B 4H045
<b>GO1N 33/577</b>	C12N 5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-154896 (P2004-154896)	(71) 出願人	501087249 株式会社ホリバ・バイオテクノロジー 京都府京都市南区吉祥院宮の東町2番地
(22) 出願日	平成16年5月25日(2004.5.25)	(71) 出願人	302060306 大塚化学株式会社 大阪府大阪市中央区大手通3丁目2番27号
(31) 優先権主張番号	特願2004-27838 (P2004-27838)	(74) 代理人	100092266 弁理士 鈴木 崇生
(32) 優先日	平成16年2月4日(2004.2.4)	(74) 代理人	100104422 弁理士 梶崎 弘一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100105717 弁理士 尾崎 雄三
		(74) 代理人	100104101 弁理士 谷口 俊彦
		最終頁に続く	

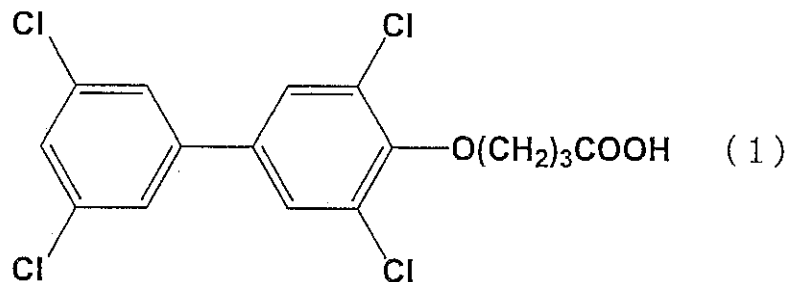
(54) 【発明の名称】 コプラナーPCBハプテン、コプラナーPCBに対する抗体およびそれを用いる免疫学的測定方法

(57) 【要約】

【課題】コプラナーPCBに対して高感度かつコプラナーPCB間の類似化合物に対する交差反応性の明確な抗体を作製するためのハプテンおよびコプラナーPCB抗体、ならびに当該抗体を用いた感度および定量性に優れたコプラナーPCBの免疫学的測定キットおよび免疫学的測定方法を提供する。

【解決手段】下記式(1)：

【化1】



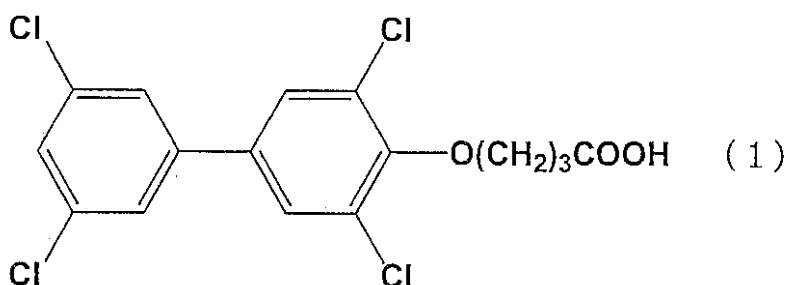
で表わされる構造を有する化合物、前記化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるコプラナーPCBに対するモノクローナル抗体、前記抗体を産生するハイブリドーマ、前記抗体を含んでなるコプラナーP

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式(1)：

## 【化 1】



10

で表わされる構造を有する化合物。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるコプラナー PCB に対する抗体。

## 【請求項 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項 2 に記載の抗体。

## 【請求項 4】

20

PCB 80 の測定方法に使用される、請求項 3 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 5】

PCB 80、PCB 126、PCB 169、PCB 111 および PCB 189 からなるコプラナー PCB 群の測定方法に使用される、請求項 4 に記載のモノクローナル抗体。

## 【請求項 6】

請求項 3 ~ 5 いずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項 7】

前記ハイブリドーマが PK-4N2 (FERM P-19640) または PK-0T2 である請求項 6 に記載のハイブリドーマ。

## 【請求項 8】

30

請求項 3 ~ 5 いずれかに記載のモノクローナル抗体を含んでなるコプラナー PCB の測定キット。

## 【請求項 9】

さらに固相化抗原を含んでなる請求項 8 に記載のコプラナー PCB の測定キットであって、前記固相化抗原は請求項 1 に記載の化合物とは異なる化合物をハプテン部分として含むものである、キット。

## 【請求項 10】

前記固相化抗原のハプテン部分が 4-(2,4-ジクロロフェノキシ)酪酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸、または 2,4-ジクロロフェニル酢酸である請求項 9 に記載のキット。

40

## 【請求項 11】

請求項 3 ~ 5 いずれかに記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするコプラナー PCB の測定方法。

## 【請求項 12】

請求項 8 ~ 10 いずれかに記載のキットを用いることを特徴とするコプラナー PCB の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

50

本発明は、コプラナーPCBハプテン、コプラナーPCBに対する抗体およびそれを用いる免疫学的測定方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

PCB（ポリ塩化ビフェニル）は、化学的安定性や低い電気伝導性のため絶縁体や潤滑油などの様々な工業製品に利用されてきた。しかし、PCBは肝臓や甲状腺などへの毒性があり、とりわけノンオルト置換型PCBはコプラナーPCBと呼ばれ、ダイオキシンと類似した作用を示す。日本におけるPCBの生産は1972年に中止されたが、PCBは廃棄物などから環境に流出しており、人の健康や野生生物に影響を及ぼす恐れがある。

【0003】

そこで、環境におけるPCB残留量をモニタリングすることは極めて重要である。一般に、PCBの測定はガスクロマトグラフィーを用いた機器分析で行われるが、この手法は煩雑で費用がかかる。

【0004】

一方、免疫学的測定法は、抗原抗体反応を利用して抗原の測定を行うもので、測定精度が優れているばかりでなく、迅速、簡便かつ経済的な測定法である。従来、免疫学的測定法は、臨床診断の分野で患者の病態解析法の一つとして大きな役割を担ってきたが、PCBのような環境負荷化学物質の測定へも適用が進んでいる。近年、コプラナーPCBの中でも特に毒性の高いPCB126やPCB169の測定が試みられている。

【0005】

抗体には、一般に免疫したウサギやヤギなどから血液を採取後その中に含まれる抗体を分離・精製するいわゆるポリクローナル抗体や、抗体産生能を持つクローン化ハイブリドーマの分泌する抗体を分離・精製するいわゆるモノクローナル抗体がある。これらの抗体は、反応性において十分な性能を持つが、PCBが水に不溶性であることから限定された条件下で測定しなければならないこと、および類似の構造を有する化学物質間で交差反応が起きる問題点があった。

【0006】

前記免疫学的測定法を利用したPCBの検出方法としては、50（v/v）%有機溶媒水溶液中で検出する方法（特許文献1を参照）、生物または化学発光を測定することによる検出方法（特許文献2を参照）、コプラナーPCBを含むダイオキシン類を異性体レベルで検出する方法（特許文献3を参照）などが知られているが、特許文献1または3に記載の方法では検出感度が低い点、特許文献2に記載の方法では抗体の交差反応性については考慮されていない点などの問題があり、PCBの検出感度および定量性において未だ満足できるような方法は知られていない。

【特許文献1】特開2000-191699号公報

【特許文献2】特開2001-66311号公報

【特許文献3】特開2002-228660号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、コプラナーPCBに対して高感度かつコプラナーPCB間の類似化合物に対する交差反応性の明確な抗体を作製するためのハプテンおよびコプラナーPCB抗体、ならびに当該抗体を用いた感度および定量性に優れたコプラナーPCBの免疫学的測定キットおよび免疫学的測定方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、コプラナーPCBの中で弱いエストロゲン様活性を示し、ヒトや野生生物への影響が懸念されるPCB80をハプテン候補として用いることにより、意外にもPCB80のみならず毒性の高いコプラナーPCBも高感度かつ定量的に検出できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

10

20

30

40

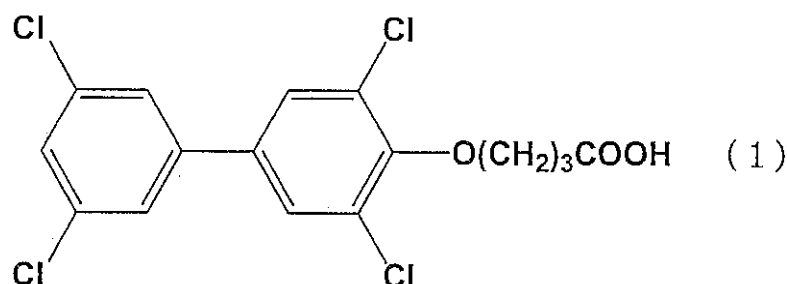
50

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、下記式 ( 1 ) :

【 0 0 1 0 】

【 化 1 】



10

で表わされる構造を有する化合物に関する。

【 0 0 1 1 】

本発明は、前記化合物をハプテンとし、当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるコプラナー PCB に対する抗体に関する。前記抗体は、モノクローナル抗体であることが好ましい。

【 0 0 1 2 】

前記モノクローナル抗体は、PCB 80 の測定方法に使用されることが好ましい。また、前記モノクローナル抗体は、PCB 80、PCB 126、PCB 169、PCB 111 および PCB 189 からなるコプラナー PCB 群の測定方法に使用されることが好ましく、さらに PCB 126 および PCB 169 の測定方法に使用されることが好ましい。

20

【 0 0 1 3 】

本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。前記ハイブリドーマは、PK-4N2 (FERM P-19640) または PK-0T2 であることが好ましい。

【 0 0 1 4 】

本発明は、前記モノクローナル抗体を含んでなるコプラナー PCB の測定キットに関する。前記キットは、さらに固相化抗原を含んでなり、前記固相化抗原は前記式 ( 1 ) の化合物とは異なる化合物をハプテン部分として含むものであることが好ましい。

30

【 0 0 1 5 】

前記キットにおいて、前記固相化抗原のハプテン部分が 4 - ( 2 , 4 - ジクロロフェノキシ ) 酪酸、2 , 4 - ジクロロフェノキシ酢酸、2 , 4 - ジクロロフェノキシプロピオン酸、または 2 , 4 - ジクロロフェニル酢酸であることが好ましい。

【 0 0 1 6 】

また、本発明は、前記モノクローナル抗体または前記キットを用いることを特徴とするコプラナー PCB の測定方法に関する。

【 発明の効果 】

40

【 0 0 1 7 】

本発明の化合物は、コプラナー PCB ハプテンとして好適に用いられるものである。当該ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより、動物においてコプラナー PCB に対する免疫応答を良好に惹起することができ、特異的かつ高感度なコプラナー PCB 抗体を得ることができる。

【 0 0 1 8 】

本発明の抗体は、特異的かつ高感度にコプラナー PCB を検出することができる。当該抗体がモノクローナル抗体の場合、コプラナー PCB、特に PCB 80 に対して高感度であり、しかも他の類似化合物に対する交差反応性が明確である。前記モノクローナル抗体を交差反応性により単独または組み合わせて用いることにより、PCB 80 に構造が類似

50

する他のコプラナーPCBをも同時に検出することができるとともに、それらの類似化合物を分別して検出することもできる。

【0019】

本発明のハイブリドーマは、前記モノクローナル抗体を安定して産生することができ、当該ハイブリドーマを培養することにより、大量のモノクローナル抗体を製造することができる。

【0020】

本発明のキットは、本発明のモノクローナル抗体を含むことにより、コプラナーPCBの免疫学的測定方法に好適に用いられ、コプラナーPCBを特異的、高感度および簡便に測定することのできる手段を提供することができる。本発明のキットが前記式(1)とは異なる構造を有する化合物を含有する固相化抗原をさらに含む場合、より高感度に測定することができる手段を提供することができる。

10

【0021】

本発明のコプラナーPCBの測定方法は、本発明のモノクローナル抗体またはキットを用いることにより感度、特異性および操作の簡便性にすぐれた効果を奏する。

【発明を実施するための最良の形態】

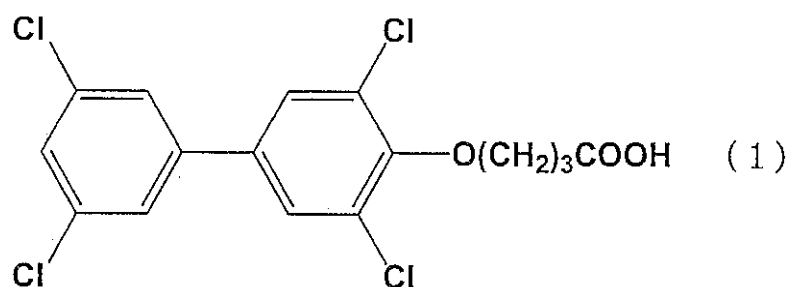
【0022】

本発明は、下記式(1)：

【0023】

【化2】

20



30

で表わされる構造を有する化合物を提供する。前記化合物は、2,6-ジクロロ-4-(3,5-ジクロロフェニル)フェノキシ酪酸であり、コプラナーPCBハプテンとして好適に使用される。

【0024】

前記式(1)において、-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-はPCB80(3,3',5,5'-四塩化ビフェニル)に導入したスペーサーアームを表わす。前記スペーサーアームは、PCB80と結合対象の高分子化合物との間に適度なスペースを与える。

【0025】

前記式(1)において、前記スペーサーアームに隣接するカルボキシ基が、後述する高分子化合物と共有結合することにより、複合体を形成する。

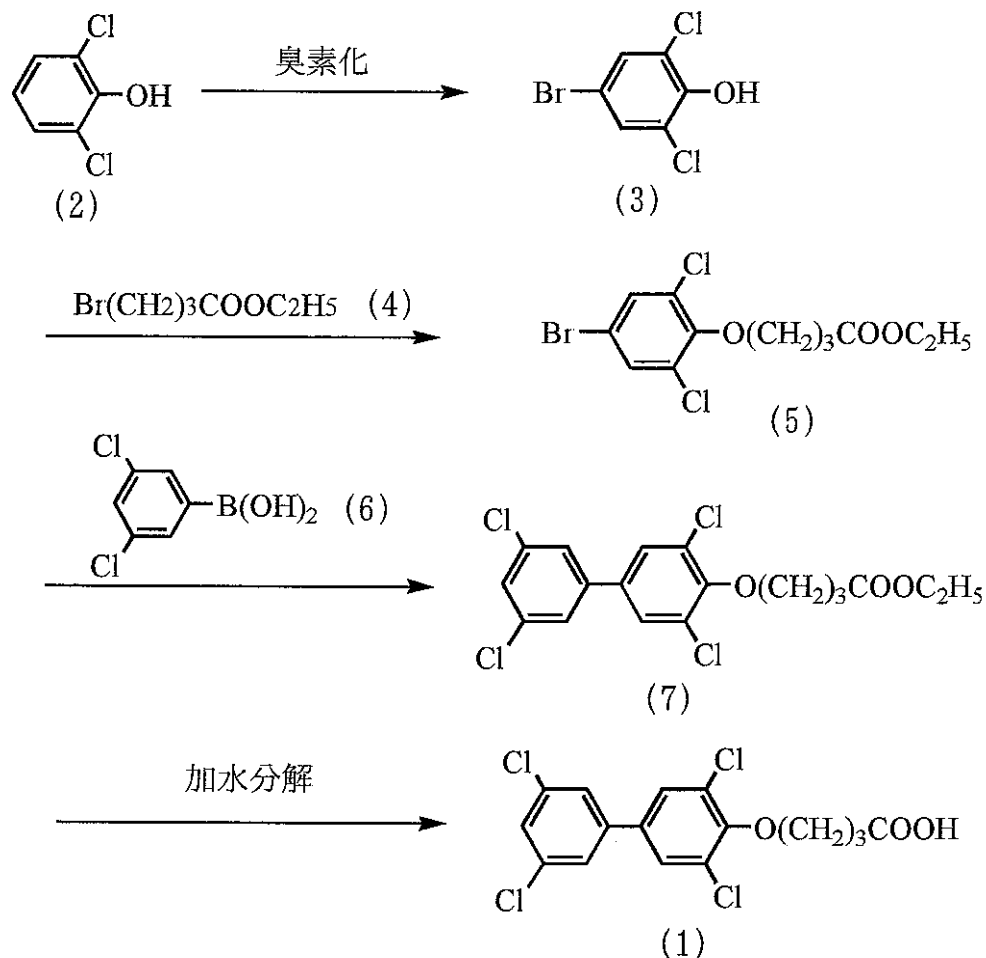
40

【0026】

前記コプラナーPCBハプテンの製造は、公知の合成方法により行なうことができ、特に限定されるものではないが、例えば下記反応式：

【0027】

## 【化 3】



10

20

で示す方法は、各工程において高収率で化合物を得ることから好適に用いられる。前記反応式において、式(2)の化合物、式(4)の化合物および式(6)の化合物は、いずれも入手が容易な化合物である。

30

## 【0028】

前記反応式において、出発原料として2,6-ジクロロフェノール(2)を用い、臭素化反応により2,6-ジクロロ-4-プロモフェノール(3)を得る(工程(a))。

## 【0029】

得られた式(3)の化合物を、塩基の存在下、4-プロモ酪酸エチル(4)と反応させて、2,6-ジクロロ-4-プロモフェノキシ酪酸エチル(5)を得る(工程(b))。

## 【0030】

得られた式(5)の化合物を、触媒(例えば、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム)の存在下、3,5-ジクロロフェニルボロニックアシッド(6)と反応させて、2,6-ジクロロ-4-(3,5-ジクロロフェニル)フェノキシ酪酸エチル(7)を得る(工程(c))。

40

## 【0031】

得られた式(7)の化合物をアルカリまたは酸により加水分解して、前記目的化合物(1)を得る(工程(d))。

## 【0032】

前記各工程における詳細な合成方法は、実施例1に記載している。

## 【0033】

このようにして得られたコプラナーPCB八ブテンは、牛血清アルブミン(BSA)、ウサギ血清アルブミン(RSA)、オボアルブミン(OVA)、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)、チログロブリン(TG)、免疫グロブリン等の高分子化合物(タンパク質)との複合体を形成させた

50

後、免疫原として用いる。

【0034】

複合体の形成方法は、公知の方法により行なうことができ、特に限定されるものではない。例えば、混合酸無水物法または活性エステル法等により前記コプラナーPCBハプテンのカルボキシ基と前記高分子化合物の官能基とを反応させて、複合体を形成することができる。

【0035】

本発明は、前記ハプテンと高分子化合物との複合体を抗原として用いることにより得られるコプラナーPCBに対する抗体を提供する。

【0036】

本明細書におけるコプラナーPCBとは、ポリ塩化ビフェニルの塩素の置換位置がノンオルト型またはモノオルト型であって各原子が同一平面上に位置する構造を有するPCBをいう。コプラナーPCBの具体例は、IUPAC#で例示すると、PCB77、PCB80、PCB81、PCB126、PCB169、PCB105、PCB111、PCB114、PCB118、PCB123、PCB156、PCB157、PCB167、PCB189があげられる。本発明においては、PCB77、PCB80、PCB81、PCB111、PCB189、PCB126およびPCB169が好ましく、その抗体が得られていないPCB80、PCB111およびPCB189ならびに毒性等価係数(TEF)が高いPCB126およびPCB169がより好ましい。

10

【0037】

本発明の抗体は、コプラナーPCB、特にPCB80に対する特異性を有する抗体である。

20

【0038】

本明細書でいう「抗体」には、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が包含され、FabフラグメントやF(ab')<sub>2</sub>フラグメントなどのように抗原結合性を有する抗体の一部も包含される。これら抗体の中でも、モノクローナル抗体が好ましい。

【0039】

前記モノクローナル抗体は、PCB80に対する特異性と他のコプラナーPCBに対する交差反応性とを明確にするため、下記のようなIC<sub>50</sub>値を有することが好ましい。ここでIC<sub>50</sub>値とは、間接競合ELISAまたは直接競合ELISAにより標準阻害曲線を求めて、50%阻害を示す検体の濃度をいう。

30

【0040】

すなわち、本抗体は、間接競合ELISAによるPCB80に対するIC<sub>50</sub>が5.0 ng/ml以下であることが好ましく、3.0 ng/ml以下がより好ましい。

【0041】

本抗体は、PCB126を測定対象とする場合、間接競合ELISAによるPCB126に対するIC<sub>50</sub>が5.0 ng/ml以下であることが好ましく、3.0 ng/ml以下がより好ましい。

【0042】

本抗体は、PCB169を測定対象とする場合、間接競合ELISAによるPCB169に対するIC<sub>50</sub>が3.0 ng/ml以下であることが好ましく、1.0 ng/ml以下がより好ましい。

40

【0043】

本抗体は、PCB111を測定対象とする場合、間接競合ELISAによるPCB111に対するIC<sub>50</sub>が25 ng/ml以下であることが好ましく、10 ng/ml以下がより好ましい。

【0044】

本抗体は、PCB189を測定対象とする場合、間接競合ELISAによるPCB189に対するIC<sub>50</sub>が5.0 ng/ml以下であることが好ましく、3.0 ng/ml以下がより好ましい。

50

## 【0045】

前記抗体の製造方法は、公知であり、本発明の抗体も常法に従って製造することができる (Current Protocol in Molecular Biology, Chapter 11.12~11.13(2000))。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って前記コプラナーPCBハプテンと高分子化合物との複合体を形成させた後、当該複合体を家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、前記複合体を常法に従ってマウス等の非ヒト動物に免疫し、得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞をスクリーニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを培養することにより得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4 ~ 11.11)。

10

## 【0046】

抗体の調製は、限外ろ過、硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどの濃縮・精製法を適宜組み合わせで行うことができる。

## 【0047】

また、本発明は、前記モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。以下、マウスでのハイブリドーマの作製方法についてより詳細に説明する。

## 【0048】

以下、Balb/cマウスを例にして説明する。前記のように調製した抗原(免疫原)を2mg/ml程度になるように生理的リン酸緩衝液に溶解し、アジュバントと等量混合した後、Balb/cマウスに腹腔内に投与する。その後、約2週間毎に追加免疫する。尾血管から採取した血液の血清中の抗体力価が高くなった前記マウスの脾臓を摘出し、DMEM培地(ダルベッコ改変イーグル培地)を入れたシャーレ内で前記脾臓から細胞を取り出す。培地を遠沈管に移し、大きな組織片を沈降させ、脾臓細胞が浮遊している上清を静かに取り、単細胞の懸濁液を低速で遠心分離して細胞を集め、脾臓細胞を調製する。マウスのミエローマ細胞(P3x63Ag8.653)を細胞数の比で5:1(ミエローマ細胞:脾臓細胞)になるように混合し、低速で遠心分離して細胞を集める。沈殿細胞をほぐした後、37℃に温めておいた50%ポリエチレングリコール(分子量1,500)溶液1mlをゆっくり加え細胞融合を行う。細胞融合後、DMEM培地9mlを加え、さらに含牛胎児血清DMEM培地40mlを添加する。遠心分離によって集めた細胞に、細胞数が $5 \times 10^5$ 個/mlになるようにHAT培地を加えて懸濁し、細胞懸濁液を96穴プラスチックプレートに250 $\mu$ l/ウェルの量で分注して、37℃、5%炭酸ガス、加湿条件下のインキュベーター中で培養する。1週間後、ウェル中の培地の半量をHAT培地で置換して、10日から14日間培養する。培養液中の抗体の活性をELISAで調べ、目的とする抗体を産生しているウェルの細胞について、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを行う。クローニングにより、抗コプラナーPCB抗体を産生している安定なハイブリドーマ株を得る。

20

30

## 【0049】

本発明では、前記方法によりハイブリドーマを作製し、PK-0T2、PK-4N2等のハイブリドーマ株を樹立した。このうち、PK-4N2について、寄託番号FERM P-19640の下、2004年1月22日に独立行政法人産業技術総合研究所、特許生物寄託センター(郵便番号305-0046、茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託した。

40

## 【0050】

本発明のハイブリドーマは、培地(例えば、10%牛胎児血清を含むDMEM)を用いて培養し、その培養液の遠心上清をモノクローナル抗体溶液とすることができる。また、本ハイブリドーマを由来する動物の腹腔に注入することにより、腹水を生成させ、得られた腹水をモノクローナル抗体溶液とすることができる。これらの抗体溶液は、さらに上述のように精製・濃縮することができる。

50

## 【0051】

また、本発明は、前記抗体を含むコプラナーPCBの測定キットに関する。本発明の測定キットは、コプラナーPCB、好ましくはPCB80に特異的に結合する抗体を含むことにより、コプラナーPCBを簡便に測定することができ、後述のコプラナーPCBの測定方法に好適に使用することができる。前記キットは、さらに、測定法に応じて、標識された二次抗体もしくは標識されたコプラナーPCBハプテン（抗原）、緩衝液、検出試薬および/またはコプラナーPCB標準溶液等を含む。

## 【0052】

好ましいキットは、下記間接競合ELISA法または直接競合ELISA法に用いられるものである。直接競合ELISA法に用いる場合、本キットは、本発明のモノクローナル抗体を固相化した担体をさらに含むことが好ましい。この場合、下記直接競合ELISA法の工程(1)を省略することができる。

## 【0053】

間接競合ELISA法に用いる場合、本キットは、さらに固相化抗原を含むものが好ましく、当該固相化抗原を固相化した担体を含むことが好ましい。この場合、下記間接競合ELISA法の工程(1)を省略することができる。

## 【0054】

前記固相化抗原は、本発明の抗体を製造するために用いるハプテンとは異なるハプテンを含むものである。前記固相化抗原のハプテン部分は、4-(2,4-ジクロロフェノキシ)酪酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸、または2,4-ジクロロフェニル酢酸であることが好ましい。

## 【0055】

また、前記固相化抗原は、前記固相化抗原用ハプテンと、牛血清アルブミン(BSA)、ウサギ血清アルブミン(RSA)、オボアルブミン(OVA)、スカシ貝ヘモシアニン(KLH)、チログロブリン(TG)、免疫グロブリン等の高分子化合物(タンパク質)との複合体を形成することにより得られる。

## 【0056】

前記固相化抗原用のハプテンは、公知の方法により合成することができ、市販品を利用することもできる。複合体の形成方法は、公知の方法により行なうことができ、特に限定されるものではない。例えば、混合酸無水物法または活性エステル法等により前記固相化抗原用ハプテンのカルボキシ基と前記高分子化合物の官能基とを反応させて、複合体を形成することができる。

## 【0057】

固相化抗原用のハプテンとして抗体製造用ハプテンと異なるものを選択することにより、抗体製造用ハプテンと同じものを固相化抗原用のハプテンとして用いてコプラナーPCBを測定した場合と比較して、感度が1~15倍上昇する。

## 【0058】

本発明のキットは、下記間接競合ELISA法に用いる場合、前記固相化抗原、固相化抗原を保持する担体、コプラナーPCB抗体、酵素標識された二次抗体および検出試薬などを含む。

## 【0059】

さらに、本発明は、前記抗体またはキットを用いることを特徴とするコプラナーPCBの測定方法に関する。測定方法としては、通常の抗原-抗体反応を利用する方法であれば特に制限されず、放射性同位元素免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(ELISA)、蛍光もしくは発光測定法、凝集法、イムノプロット法、イムノクロマト法等(Meth. Enzymol., 92, 147-523 (1983), Antibodies Vol.II IRL Press Oxford (1989))が挙げられるが、感度や簡便性等の点からELISAが好ましい。ELISAに用いる酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ等が挙げられる。

## 【0060】

10

20

30

40

50

E L I S A による測定法は、間接競合 E L I S A または直接競合 E L I S A などがあげられる。例えば、間接競合 E L I S A は、以下のような手順により行うことができる。

【 0 0 6 1 】

( 1 ) 固相化抗原を担体に固相化する

用いる担体は、通常の E L I S A に用いる担体であれば特に制限されないが、96穴、48穴、192穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用抗原を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗原の濃度は、通常  $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$  から  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【 0 0 6 2 】

( 2 ) 担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗原が吸着していない固相表面部分を、抗原と無関係なタンパク質等によりブロッキングする

ブロッキング剤としては、B S A もしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース（大日本製薬社製）等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、例えば、約4で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記(1)と同じ緩衝液を使用することができる。

【 0 0 6 3 】

( 3 ) 前記(1)および(2)で処理された固相表面に各種濃度のコブラナー P C B を含む試料および本発明のモノクローナル抗体溶液を加え、該抗体を前記固相化抗原およびコブラナー P C B に競合的に反応させて、固相化抗原 - 抗体複合体およびコブラナー P C B - 抗体複合体を生成させる

反応は、通常4～37で1～2時間程度で行うことができる。

【 0 0 6 4 】

コブラナー P C B は、水に不溶性であるため、反応溶液中には各種有機溶媒を含有することができる。前記有機溶媒としては、コブラナー P C B を溶解させ、かつ抗原 - 抗体反応を阻害しない範囲で有機溶媒およびその含有量を選択すればよい。具体的には、メタノール、ジメチルスルホキシドなどがあげられ、含有量は、5～50重量%程度である。

【 0 0 6 5 】

( 4 ) 固相化抗原 - 抗体複合体の量を測定することにより、予め作成した検量線から試料中のコブラナー P C B の量を決定することができる

固相化抗原 - 抗体複合体の量は、酵素標識した二次抗体（コブラナー P C B 抗体を認識する抗体）を添加して測定することができる。例えばコブラナー P C B 抗体としてマウスモノクローナル抗体を用いる場合、酵素標識（例えば、ペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ等）した抗マウス - ヤギ抗体を用いて、担体に結合したコブラナー P C B 抗体と反応させるのが望ましい。反応は、前記(3)と同様の条件下で行えばよい。反応後、緩衝液で洗浄する。

【 0 0 6 6 】

( 5 ) 担体に結合した二次抗体の標識酵素と反応する発色基質溶液を加え、吸光度を測定することによって検量線からコブラナー P C B の量を算出することができる

二次抗体に結合する酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、例えば、過酸化水素と、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンまたはo-フェニレンジアミンを含む発色基質溶液を使用することができる。通常、発色基質溶液を加えて室温で約10分程度反応させた後、硫酸を加えることにより酵素反応を停止させる。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを使用する場合、450nmの吸光度を測定する。o-フェニレンジアミンを使用する場合、492nmの吸光度を測定する。なお、バックグランド値を補正するため、630nmの吸光度も同時に測定することが望ましい。

【 0 0 6 7 】

二次抗体に結合する酵素としてアルカリホスファターゼを使用する場合には、例えばp-ニトロフェニルリン酸を基質として発色させ、NaOH溶液を加えて酵素反応を止め、

10

20

30

40

50

415 nmでの吸光度を測定する方法があげられる。

【0068】

コプラナーPCBを添加しない反応溶液の吸光度に対して、コプラナーPCBを添加して抗体と反応させた溶液の吸光度の減少率を阻害率として計算する。既知の濃度のコプラナーPCBを添加した反応液の阻害率により予め作成しておいた検量線を用いて、試料中のコプラナーPCBの濃度を算出することができる。

【0069】

別の態様として、コプラナーPCBの測定は、例えば以下に述べるような本発明のモノクローナル抗体を用いた直接競合ELISAによって行うこともできる。

【0070】

(1) 本発明のモノクローナル抗体を、担体に固相化する

用いる担体は、96穴、48穴、192穴等のマイクロタイタープレートが好ましい。固相化は、例えば、固相化用抗体を含む緩衝液を担体上に載せ、インキュベーションすればよい。緩衝液中の抗体の濃度は、通常0.01 µg/mlから100 µg/ml程度である。緩衝液としては、検出手段に応じて公知のものを使用することができる。

【0071】

(2) 担体の固相表面へのタンパク質の非特異的吸着を防止するため、固相化用抗体が吸着していない固相表面部分を、抗体と無関係なタンパク質等によりブロッキングする

ブロッキング剤としては、BSAもしくはスキムミルク溶液、または市販のブロックエース(大日本製薬社製)等を使用することができる。ブロッキングは、前記ブロッキング剤を担体に添加し、例えば、約4で一晚インキュベーションした後、洗浄液で洗浄することにより行われる。洗浄液としては特に制限はないが、前記(1)と同じ緩衝液を使用することができる。

【0072】

(3) 各種濃度のコプラナーPCBを含む試料に、コプラナーPCBハプテンと酵素を結合させた酵素結合ハプテンを加えた混合物を調製する

酵素結合ハプテンの調製は、コプラナーPCBハプテンを酵素に結合する方法であれば特に制限なく、いかなる方法で行ってもよい。

【0073】

(4) 工程(3)の混合物を工程(2)で得られた抗体固相化担体と反応させる

コプラナーPCBと酵素結合ハプテンとの競合阻害反応により、これらと固相化担体との複合体が生成する。反応は例えば、約25で約1時間行う。反応終了後、緩衝液で担体を洗浄し、固相化抗体と結合しなかった酵素結合ハプテンを除去する。

【0074】

固相化抗体-酵素結合ハプテン複合体の量を測定することにより、予め作成した検量線から試料中のコプラナーPCBの量を決定する。

【0075】

本工程において酵素結合ハプテンの酵素に反応する発色基質溶液を前述の間接競合阻害ELISA法と同様に加え、吸光度を測定することにより検量線からコプラナーPCBの量を算出することができる。

【0076】

前記本発明の測定方法においては、測定対象物に応じた前処理をして試料とした後、前記間接競合ELISAまたは直接競合ELISAの工程(3)に供せられる。

【0077】

測定対象物が土壌または食品の場合、コプラナーPCBが抽出できる全ての方法を用いることができる。抽出物は、メタノールに転溶させて緩衝液で希釈後、測定試料にする。簡便法として、メタノールで抽出し緩衝液で希釈したものをそのまま試料とすることも可能である。具体的には、例えば試料5gに、メタノール5mlを加えて20分間振とうする。室温で30分間静置した後、抽出物の上層2mlを2500rpmで10分間遠心分離する。上清を蒸留水で1:4に希釈し、これを前記工程(3)に供する。

10

20

30

40

50

## 【0078】

測定対象物が環境水の場合、抽出工程を必要とせず、直接測定試料とすることが可能である。

## 【0079】

本発明のモノクローナル抗体PK-0T2およびPK-4N2を用いて、以下のようなコプラナーPCB群の測定方法を実施することができる。PK-0T2は、PCB80に対して $IC_{50}$ 値が $2.6 \text{ ng/ml}$ と高感度に反応するのに対して、他のPCB、例えばPCB77、PCB81、PCB126、PCB169およびPCB189とは全く反応しないことから、本抗体を用いることによって今までイムノアッセイによる測定法のなかったPCB80の特異的かつ高感度測定を実施することができる。

10

## 【0080】

一方、PK-4N2を用いることによって、PCB80に対して $IC_{50}$ 値が $0.46 \text{ ng/ml}$ 、PCB126に対して $IC_{50}$ 値が $2.3 \text{ ng/ml}$ 、PCB169に対して $IC_{50}$ 値が $0.63 \text{ ng/ml}$ 、PCB111に対して $IC_{50}$ 値が $2.2 \text{ ng/ml}$ 、PCB189に対して $IC_{50}$ 値が $1.9 \text{ ng/ml}$ と、5種類のコプラナーPCBのグループ特異的かつ高感度測定を実施することができる。また、PK-0T2とPK-4N2とを適宜組み合わせ、感度と特異性の相違に基づいて分別することが可能である。

## 【0081】

## [実施例]

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

20

## 【0082】

## 実施例1

## (a) 2,6-ジクロロ-4-プロモフェノール(3)の合成

2,6-ジクロロフェノール(2)  $3.26 \text{ g}$  (20ミリモル)を酢酸20mlに溶解し、室温攪拌下に臭素  $3.36 \text{ g}$  (21ミリモル)を滴下した。得られた混合物を90で5時間加熱攪拌した後、反応混合物を減圧下に濃縮した。得られた残渣を水中に注ぎ込み、酢酸エチル70mlで抽出した。酢酸エチル抽出液を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。留去後に得られた粗結晶をn-ヘキサンから再結晶して、標記目的化合物  $4.07 \text{ g}$  (収率84%)を得た。

30

## 【0083】

## (b) 2,6-ジクロロ-4-プロモフェノキシ酪酸エチル(5)の合成

200mlのナスフラスコに、2,6-ジクロロ-4-プロモフェノール(3)  $2.42 \text{ g}$  (10ミリモル)、4-プロモ酪酸エチル(4)  $1.95 \text{ g}$  (10ミリモル)、炭酸カリウム  $1.38 \text{ g}$  (10ミリモル)およびアセトニトリル50mlを加え、5時間還流した。反応混合物を減圧下に濃縮した。得られた残渣を水中に注ぎ込み、酢酸エチル70mlで抽出した。酢酸エチル抽出液を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。留去後に得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン/酢酸エチル=20/1~15/1)で精製することにより、標記目的化合物  $2.64 \text{ g}$  (収率74%)を得た。

40

## 【0084】

(c) 2,6-ジクロロ-4-(3,5-ジクロロフェニル)フェノキシ酪酸エチル(7)の合成

100mlのナスフラスコに、2,6-ジクロロ-4-プロモフェノキシ酪酸エチル(5)  $1.78 \text{ g}$  (5ミリモル)、テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)  $0.2 \text{ g}$  (0.173ミリモル)、炭酸ナトリウム  $1.06 \text{ g}$  (10ミリモル)を水5mlに溶解した液およびベンゼン10mlを加えた。この混合物に、3,5-ジクロロフェニルボロニックアシッド(6)  $0.95 \text{ g}$  (5ミリモル)をメタノール5mlに溶解し

50

た液を加え、15時間還流した。反応混合物に飽和食塩水30mlを加え、ジエチルエーテル30mlで2回抽出した。エーテル抽出液を合わせ、これを無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を留去した。留去後に得られた粕生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（*n*-ヘキサン/酢酸エチル=15/1~10/1）で精製することにより、標記目的化合物1.86g（収率88%）を得た。

## 【0085】

(d) 2,6-ジクロロ-4-(3,5-ジクロロフェニル)フェノキシ酪酸(1)の合成

2,6-ジクロロ-4-(3,5-ジクロロフェニル)フェノキシ酪酸エチル(7)0.84g(2ミリモル)をエタノール7mlに溶解した液に、20%水酸化ナトリウム水溶液8g(4ミリモル)を加え、室温で2時間攪拌した。反応混合物を氷水中に注ぎ込み、1N-塩酸を用いて酸性(pH1)とした後、酢酸エチル30mlで2回抽出した。酢酸エチル抽出液を合わせ、これを飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去した。留去後に得られた粗結晶を酢酸エチル/*n*-ヘキサンから再結晶して、標記目的化合物0.49g(収率62%)を得た。

10

## 【0086】

実施例2(免疫原の調製)

免疫原としてスカシ貝ヘモシアニン(KLH)と本発明PCB八プテンとの結合体を、活性エステル法を用いて作製した。

## 【0087】

実施例1で製造した2,6-ジクロロ-4-(3,5-ジクロロフェニル)フェノキシ酪酸(PCB八プテン)9.45mg、N-ヒドロキシスクシンイミド2.88mgおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩4.79mgを、N,N-ジメチルホルムアミド1.5mlに溶解し、この溶液を25℃の暗所に一晩放置した。

20

## 【0088】

別途、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.2)2mlにKLHを150mg加え、一晩攪拌することにより、KLH溶液としておいた。

## 【0089】

このKLH溶液に、先に調製したPCB八プテン溶液を徐々に滴下し、4℃で3時間攪拌した。反応終了後、4℃で一晩生理的リン酸緩衝液(PBS、10mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.0)に対して透析した後、-30℃で貯蔵した。上記のようにして得られたPCB八プテンとKLHとの結合体を免疫原として使用した。

30

## 【0090】

実施例3(固相化抗原の調製)

固相化抗原としてウシ血清アルブミン(BSA)と4-(2,4-ジクロロフェノキシ)酪酸(2,4-DB)との結合体を、活性エステル法を用いて作製した。

## 【0091】

2,4-DB6.27mg、N-ヒドロキシスクシンイミド2.88mgおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩4.79mgを、N,N-ジメチルホルムアミド1.5mlに溶解し、この溶液を25℃の暗所に一晩放置した。別途、0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.2)2mlにBSAを50mg加え、一晩攪拌することにより、BSA溶液としておいた。

40

## 【0092】

このBSA溶液に、先に調製した2,4-DB溶液を徐々に滴下し、4℃で3時間攪拌した。反応終了後、4℃で一晩生理的リン酸緩衝液(PBS、10mMリン酸緩衝液、150mM NaCl、pH7.0)に対して透析した後、-30℃で貯蔵した。このようにして得られた2,4-DBとBSAとの結合体を固相化抗原として使用した。

## 【0093】

実施例4(モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製)

50

実施例2で調製した免疫原を2mg/mlとなるようにPBSに溶解し、これに等量のアジュバント(商品名:Titer Max Gold CytRx Co製)を混合した。この混合物100 $\mu$ lを、4~5週齢のメスのBalb/cマウスに腹腔内投与した。その後、上記と同様の手順で、アジュバント(商品名:Titer Max Gold CytRx Co製)と等量混合した0.5mg/mlの免疫原100 $\mu$ lを2週間毎に追加免疫した。尾血管から採取した血液の血清中の抗体力価が高くなったマウスの脾臓を摘出し、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM培地)を入れたシャーレ内で摘出した脾臓をハサミで傷をつけ、注射筒で培地を脾臓内に注入して細胞を取り出した。培地を遠沈管に移し、大きな組織片を沈降させるために5分間静置した。脾細胞が浮遊している上清を静かに取り、単細胞の懸濁液を1250rpmで5分間遠心分離して細胞を集め、脾細胞を調製した。

10

## 【0094】

マウスのミエローマ細胞(P3X63Ag8.653)を細胞数の比で5:1(ミエローマ細胞:脾細胞)になるように脾細胞と混合し、300 $\times$ gで5分間遠心分離して細胞を集めた。上清を除去し、遠心管をはじいて沈殿した細胞をほぐした後、37 $^{\circ}$ Cに温めておいた50%ポリエチレングリコール(分子量1500)溶液1mlを60秒かけてゆっくり加え、細胞融合を行った。次いで、DMEM培地9mlを加え、更にウシ胎児血清を10%含むDMEM培地40mlを添加した。遠心分離によって集められた細胞を、細胞数が $5 \times 10^5$ 個/mlになるようにHAT培地を加えた。細胞懸濁液を96穴細胞培養プレートに250 $\mu$ l/ウェルの量を分注して、37 $^{\circ}$ Cにて5%二酸化炭素の気相中でインキュベーションした。

20

## 【0095】

1週間後、ウェル中の培地の半量を新鮮なHAT培地で置換して、12日間培養した。培養上清中の抗体の活性をELISA法で調べ、目的とする抗体を産生しているウェルの細胞について、96穴細胞培養プレートで、10%ウシ胎児血清と8 $\mu$ g/mlのインシュリンを含むHAT培地を用い、限界希釈法によりハイブリドーマのクローニングを2度行った。クローニングした結果、最終的に抗PCB抗体を産生する安定なハイブリドーマ2株を得た。このうち1つの株をPK-0T2と名付け、他の1つの株をPK-4N2と名付けた。

## 【0096】

実施例5(モノクローナル抗体の作製)

実施例4で得られたハイブリドーマ2株(PK-0T2およびPK-4N2)を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養した。培養上清をモノクローナル抗体溶液とし、それぞれ「モノクローナル抗体PK-0T2溶液」、「モノクローナル抗体PK-4N2溶液」とした。調製したモノクローナル抗体溶液は、間接競合ELISA法の一次抗体として用い、3,3',5,5'-四塩化ビフェニル(PCB80)との反応性を調べた。

30

## 【0097】

実施例6(間接競合ELISA法によるPCB80の測定)

(1)96穴マイクロプレートに2,4-DBとBSAとの結合体(3 $\mu$ g/ml)を100 $\mu$ l/ウェルとなるように加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションしてプレートに吸着させた。PBSで4回洗浄後、PBSで4倍希釈したブロックエース(Block-Ace、大日本製薬(株)製)溶液を250 $\mu$ l/ウェルとなるように加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

40

## 【0098】

(2)モノクローナル抗体PK-0T2溶液またはモノクローナル抗体PK-4N2溶液をPBS(pH8.0)で2倍希釈した溶液とPCB80標準溶液の各々50 $\mu$ lをウェルに加え、PK-0T2は25 $^{\circ}$ Cで1時間、PK-4N2は4 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

## 【0099】

50

(3) 西洋ワサビペルオキシダーゼを結合した抗マウス IgG ヤギ抗体 (二次抗体) を PBS で 2000 倍に希釈し、該希釈液 100  $\mu$ l をウェルに加え、25 で 1 時間インキュベーションした後、プレートを洗浄した。

【0100】

(4) 0.2% の o-フェニレンジアミン発色溶液 (100 mM リン酸クエン酸緩衝液 (pH 5.0)、0.003% 過酸化水素水) 100  $\mu$ l をウェルに加え、25 で 10 分間インキュベーションした後、4 N 硫酸 50  $\mu$ l をウェルに加えて酵素反応を止め、492 nm および 630 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0101】

好適には、上記の (2) に記載の工程において、モノクローナル抗体 PK-0T2 溶液の 1000 倍希釈溶液またはモノクローナル抗体 PK-4N2 溶液の 500 倍希釈溶液と、メタノールに溶解した PCB80 標準溶液を 50 ng/ml から 20% (v/v) メタノールを含む蒸留水で段階的に希釈した溶液をウェルに加え、二次抗体を 2000 倍希釈したものをを用いて、吸光度を測定した。B/B<sub>0</sub> (%) を次式により算出した。

$$B/B_0(\%) = (\text{PCB80 標準溶液の吸光度}) / (\text{コントロールの吸光度}) \times 100$$

モノクローナル抗体 PK-0T2 溶液についての PCB80 の標準阻害曲線およびモノクローナル抗体 PK-4N2 溶液についての PCB80 の標準阻害曲線を図 1 に示す。モノクローナル抗体 PK-0T2 溶液を用いた間接競合 ELISA 法による PCB80 の測定可能な範囲は 0.7 ng/ml ~ 7.0 ng/ml であり、50% 阻害を示す値 (IC<sub>50</sub> 値) は 2.6 ng/ml であった。また、モノクローナル抗体 PK-4N2 溶液を用いた間接競合 ELISA 法による PCB80 の測定可能な範囲は 0.15 ng/ml ~ 1.5 ng/ml であり、50% 阻害を示す値 (IC<sub>50</sub> 値) は 0.46 ng/ml であった。

【0102】

実施例 7 (抗体のメタノールに対する耐性)

PCB80 希釈液におけるメタノール濃度に対するモノクローナル抗体 PK-0T2 溶液およびモノクローナル抗体 PK-4N2 溶液の耐性を調べた。

【0103】

PCB80 標準溶液を 10% ~ 100% のメタノールを含む蒸留水で希釈したものをを用い、上記実施例 6 と同様にして PCB80 の標準阻害曲線を作成した。

【0104】

モノクローナル抗体 PK-0T2 溶液についての PCB80 の標準阻害曲線を図 2 に、モノクローナル抗体 PK-4N2 溶液についての PCB80 の標準阻害曲線を図 3 に示す。

【0105】

図 2 および図 3 から明らかなように、モノクローナル抗体 PK-0T2 溶液およびモノクローナル抗体 PK-4N2 溶液は、10% ~ 30% のメタノールでは反応性に変化がなく、メタノールに対して耐性を有していることが明らかになった。また、モノクローナル抗体 PK-0T2 溶液は、40% のメタノールでも反応性に変化がなく、メタノールに対する耐性に優れていた。

【0106】

以上の結果から、本発明のコプラナー PCB ハプテンを用いて得られるモノクローナル抗体を使用する間接競合 ELISA 法により、コプラナー PCB 分析の大幅な簡略化および測定時間の短縮が可能となり、多数の検体を迅速、簡便且つ低コストで測定できることがわかる。

【0107】

実施例 8 (抗体のコプラナー PCB 構造類似化合物に対する交差反応性)

PCB80 と化学構造が類似している化合物について抗体 PK-0T2 および PK-4N2 の交差反応性を調べた。交差反応性は、実施例 6 に記載の方法と同様にして試験化合物の IC<sub>50</sub> 値を求め、次式により計算した。

【0108】

10

20

30

40

50

交差反応率(%) = (PCB80のIC<sub>50</sub>値 / 試験化合物のIC<sub>50</sub>値) × 100  
 上記式を用いて交差反応率を算出した結果を表1に示す。

【0109】

【表1】

IUPAC no.	化合物名	TEF	PK-OT2		PK-4N2	
			IC <sub>50</sub> (ng/mL)	交叉反応性 (%)	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	交叉反応性 (%)
<b>ノンオルソPCB</b>						
80	3,3',5,5'-四塩化ビフェニル		2.6	100	0.46	100
77	3,3',4,4'-四塩化ビフェニル	0.0001	>1000	<0.3	>1000	<0.1
81	3,4,4',5'-四塩化ビフェニル	0.0001	>1000	<0.3	>1000	<0.1
126	3,3',4,4',5'-五塩化ビフェニル	0.1	>1000	<0.3	2.3	20
169	3,3',4,4',5,5'-六塩化ビフェニル	0.01	>1000	<0.3	0.63	73
<b>モノオルソPCB</b>						
105	2,3,3',4,4'-五塩化ビフェニル	0.0001	>1000	<0.3	51	0.91
111	2,3,3',5,5'-五塩化ビフェニル		22	12	2.2	21
114	2,3,4,4',5'-五塩化ビフェニル	0.0001	>1000	<0.3	320	0.15
118	2,3',4,4',5'-五塩化ビフェニル	0.0001	>1000	<0.3	95	0.48
123	2',3,4,4',5'-五塩化ビフェニル	0.0005	>1000	<0.3	63	0.74
156	2,3,3',4,4',5'-六塩化ビフェニル	0.00001	>1000	<0.3	11	4.1
157	2,3,3',4,4',5'-六塩化ビフェニル	0.0005	>1000	<0.3	11	4.4
167	2,3',4,4',5,5'-六塩化ビフェニル	0.0005	>1000	<0.3	43	1.1
189	2,3,3',4,4',5,5'-七塩化ビフェニル	0.0001	>1000	<0.3	1.9	24
<b>ジオルソPCB</b>						
133	2,2',3,3',5,5'-六塩化ビフェニル		460	0.56	810	<0.1
180	2,2',3,4,4',5,5'-七塩化ビフェニル		>1000	<0.3	>1000	<0.1
<b>ハブテン</b>						
	PCBハブテン		0.44	600	0.07	660
	4-(2,4-ジクロロフェノキシ)酪酸		750	0.35	4100	<0.1

10

20

30

TEF; 毒性等価係数(toxic equivalency factor)

表1より、抗体PK-OT2およびPK-4N2は、ノンオルソPCBであるPCB77およびPCB81ならびにジオルソPCBであるPCB133およびPCB180とは殆ど反応しなかった。抗体PK-4N2は、ノンオルソPCBであるPCB126およびPCB169、ならびにモノオルソPCBであるPCB111およびPCB189と交差反応性を示した。抗体PK-OT2は、PCB126およびPCB169とも殆ど反応せず、PCB111に対する感度がPCB80に対する感度の約0.1倍であり、PCB80に対する特異性が高いことがわかる。抗体PK-OT2とPK-4N2を組み合わせるにより、PCB80と前記その他のコプラナーPCBとを分別して検出することができる。

40

【図面の簡単な説明】

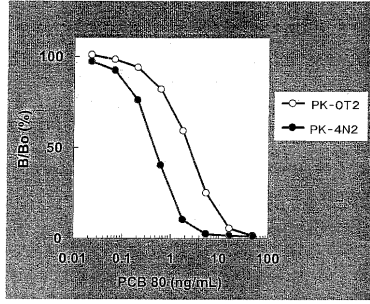
【0110】

【図1】抗体PK-OT2または抗体PK-4N2を用いた間接競合ELISA法におけるPCB80に対する標準曲線を示す。

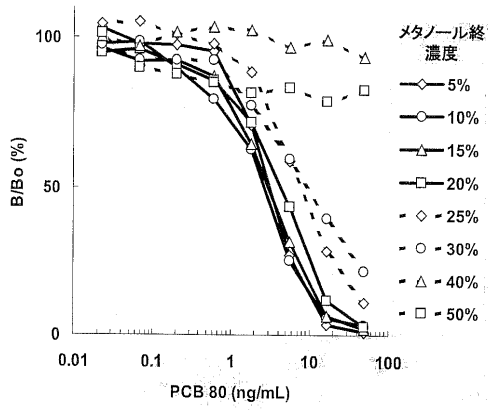
【図2】抗体PK-OT2を用いた間接競合ELISA法において、メタノールの影響を示す反応曲線である。

【図3】抗体PK-4N2を用いた間接競合ELISA法において、メタノールの影響を示す反応曲線である。

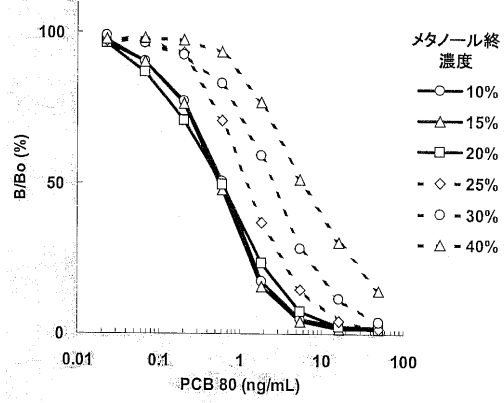
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
( C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 R 1:91 )	C 1 2 R 1:91	

(72)発明者 乾 秀之

兵庫県神戸市灘区鶴甲 2 - 4 - 5 - 4 0 4

(72)発明者 武内 哲也

兵庫県神戸市灘区篠原南町 1 - 6 - 2 0 - 1 0 2

(72)発明者 今井 哲弥

徳島県徳島市住吉 6 丁目 1 - 4 0 - 3 0 7

(72)発明者 大川 秀郎

兵庫県神戸市北区柏尾台 1 4 - 1 4

(72)発明者 三宅 司郎

京都府乙訓郡大山崎町大山崎上ノ田 1 - 5 0

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 DA13

4B065 AA92X AB05 AC14 BA08 CA25 CA46

4H006 AA01 AA03 AB80 BJ50 BM30 BM72 BP30 BS10

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA50 FA72 GA15

## 【要約の続き】

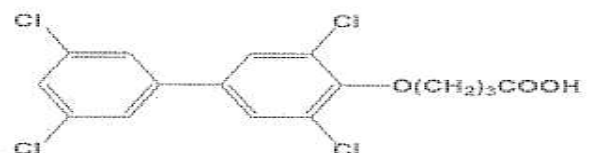
C B の測定キット、および前記抗体または前記キットを用いることを特徴とするコプラナー P C B の測定方法。

【選択図】なし

专利名称(译)	针对共面PCB半抗原的抗体，共面PCB和使用其的免疫测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005247822A</a>	公开(公告)日	2005-09-15
申请号	JP2004154896	申请日	2004-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	堀场生物技术		
申请(专利权)人(译)	有限公司HORIBA生物 大冢化学株式会社		
[标]发明人	乾秀之 武内哲也 今井哲弥 大川秀郎 三宅司郎		
发明人	乾 秀之 武内 哲也 今井 哲弥 大川 秀郎 三宅 司郎		
IPC分类号	G01N33/53 C07C59/68 C07K16/44 C12N5/10 C12P21/08 C12R1/91 G01N33/577		
FI分类号	C07C59/68 C07K16/44 G01N33/53.S G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08 C12R1/91 C12N5/00.102 C12N5/20		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA46 4H006/AA01 4H006/AA03 4H006/AB80 4H006/BJ50 4H006/BM30 4H006/BM72 4H006/BP30 4H006/BS10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/GA15		
代理人(译)	Kajisaki浩一 尾崎雄三 谷口俊彦		
优先权	2004027838 2004-02-04 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种半抗原，用于制备对共面PCB高度敏感的抗体，并且与共面PCB衍生物，共面PCB抗体和使用该抗体的共面PCB的免疫学测量试剂盒之间的类似化合物具有明显的交叉反应性敏感性和定量性，以及免疫学测量方法。ΣSOLUTION：由式(1)表示的化合物，和通过使用该化合物作为半抗原与高分子量化合物作为抗原的复合物获得的针对共面PCB的单克隆抗体，以及产生该抗体的杂交瘤，和包含抗体的共面PCB的测量试剂盒，以及使用抗体或试剂盒测量共面PCB的方法。Σ



(1)